

**Untersuchungen
zur enzymatischen Liquefaktion
von menschlichem Sperma**

von

WERNER HÜTTEL

aus Göggingen

1973

1974 № 9

Aus der Dermatologischen Klinik mit Poliklinik der
Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. O. Hornstein

Untersuchungen zur enzymatischen Liquefaktion von
menschlichem Sperma.

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
ERLANGEN - NÜRNBERG

vorgelegt von
Werner Hüttel
aus Göggingen



Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. L. Demling

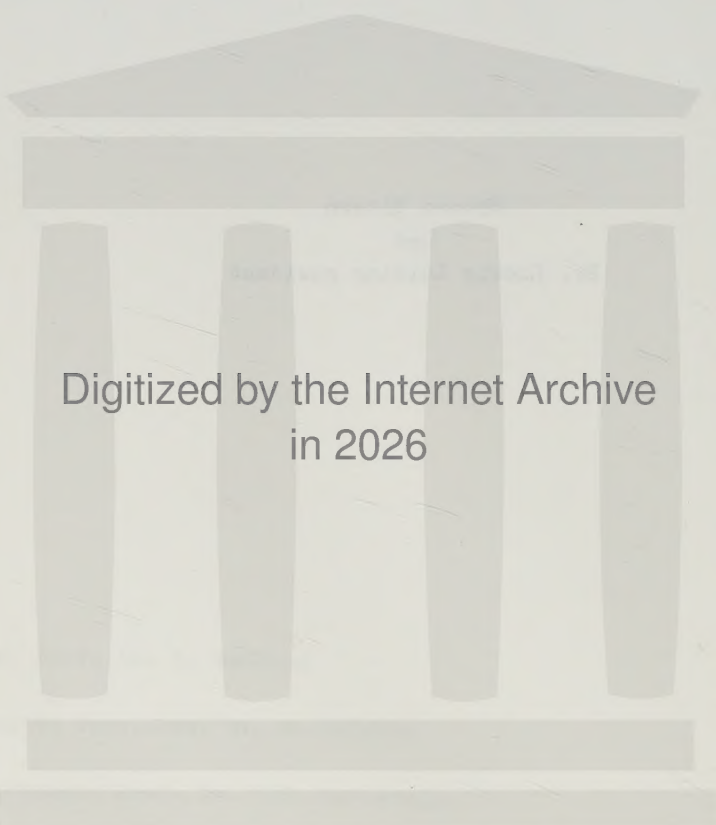
Referent: Priv.-Doz. Dr. N. Hofmann

Korreferent: Prof. Dr. O.P. Hornstein

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1973



Meinen Eltern
und
Dr. Ludwig Leißing gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Herrn Prof.Dr. O. Hornstein danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Priv.-Doz. Oberarzt Dr. N. Hofmann habe ich sehr zu danken für die nimmermüde Freundlichkeit und Hilfestellung bei der Bearbeitung des Themas.

Frl. Zieglwallner bin ich dankbar für mannigfaltige Beratung bei der Durchführung der Versuchsreihen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	3
EIGENE FRAGESTELLUNG	6
MATERIAL UND METHODEN	7
ERGEBNISSE	12
1.1. Sperma-Wiederverflüssigung und Viskosität nach Dornase-Behandlung	12
1.2. Spermatozoen-Motilität nach Dornase-Liquefaktion	15
1.3. Spermatozoen Agglomerationen nativ und Dornase-liquefiziert	19
2.1. Enzymatische Liquefaktion mit α -Amylase, Trypsin und Dornase in 0,9%iger Na-Cl-Lösung	21
2.2. Spermatozoen-Agglomeration bei enzymatischer Liquefaktion mit α -Amylase, Trypsin und Dornase in 0,9%iger Na-Cl-Lösung	25
3.1. Dilutionseffekt mit Ringerlösung	26
3.2. Vergleich von Nativ-Sperma mit enzymatisch-liquefiziertem im Ringer-Milieu	28
3.3. Vergleich von Dornase-liquefiziertem Sperma in Ringer und Na-Cl-Milieu	31
3.4. Agglomerationsphänomene im 24-Stunden-Versuch bei nativ- und Enzym-behandeltem Sperma in Ringer und Na-Cl-Milieu	34
DISKUSSION	38
ZUSAMMENFASSUNG	44
LITERATUR	47

EINLEITUNG

Das menschliche Sperma unterliegt beim Vorgang der Ejakulation einer Koagulation der Spermaflüssigkeit, die sich nach durchschnittlich 10 bis 30 Minuten wieder auflöst. Die resultierende Konsistenz der Spermaflüssigkeit wird als Viskosität bezeichnet.

Physiko-chemisch handelt es sich bei der Koagulation nach MANN um eine Gel-Bildung, die sich chemisch als Protein-denaturierung darstellt. Dieser Vorgang wird enzymatisch gesteuert, wobei das in der Prostata gebildete Enzym Versiculase auf das Proenzym der Bläschendrüsen Procoagulase als Aktivator einwirkt. Die Koagulase verursacht in einem zweiten Schritt des Enzymablaufs die eigentliche Koagulierung des in den Bläschendrüsen sezernierten Koagulinogens.

Die anschließende Verflüssigung vollzieht sich in mehreren Schritten, die wiederum enzymatisch gesteuert werden. Dabei bauen Enzymaktivitäten der Prostatasekretion (Plasminogenaktivator, fibrinolytisches Enzym, proteolytische Enzyme) im Wechselspiel mit einem Inhibitorenzym der Bläschendrüsen das Gel-Gerüst ab. Ob es sich bei der Sperma-Verflüssigung lediglich um Vorgänge am Eiweiß und nicht auch um Prozesse an Nucleotid-Verbindungen handeln kann, ist bisher noch nicht klar.

Unter pathologischen Bedingungen wird häufig eine Verlän-

gerung der Spermaverflüssigungszeit angetroffen. So konnte SAITZ-HERMSTEIN (30) bei 1218 Spermaproben von Patienten der andrologischen Sprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik Erlangen in den Jahren 1969 bis 1972 in 143 Fällen Verflüssigungszeiten von 30 bis 40 Minuten, in 263 Fällen von 40 bis 60 Minuten, in 135 Fällen Verflüssigungszeiten von 60 und mehr Minuten ermitteln. In 15 Fällen war die Wiederverflüssigung insgesamt unvollständig. Dieselben Spermaproben zeigten eine normale Viskosität in 582 Fällen, eine verminderte in 173 Fällen, eine vermehrte Viskosität in 480 Fällen. SAITZ-HERMSTEIN hatte aufzeigen können, daß verlängerte Wiederverflüssigungszeit und erhöhte Spermaviskosität signifikant häufig korreliert waren.

Beobachtungen derartiger Störungen der Spermaverflüssigung und der Spermaviskosität sowie Versuche einer therapeutischen Beeinflussung sind besonders im anglo-amerikanischen Schrifttum publiziert worden.

So berichteten BUNGE und SHERMAN (7) über eine enzymatische Liquefaktion von schlecht bzw. unvollständig verflüssigten Spermaproben durch α -Amylase. Verwendet wurde eine 5%ige-Amylase in Locke'scher Lösung entsprechend einer Konzentration von 125 Einheiten/ml. 1/3 der Enzymlösung wurde zu 2/3 des Spermas zugegeben. Erreicht wurde eine vollständige Wiederverflüssigung innerhalb von 20 Minuten, ohne daß die Spermatozoenmotilität und -vitalität beeinträchtigt wurden.

Die Wirkung von α -Amylase auf das Spermaoagulat ist nach den dargelegten biochemischen Voraussetzungen zunächst verwunderlich, da es sich um ein glykolytisches und nicht um ein proteolytisches Ferment handelt.

1962 hatte AMELAR (1) über Versuche mit einem mucolytischen Detergens berichtet, bei denen ausschließlich Sperma inseminiert wurde. Es wurde Fertilität erreicht.

1970 berichtete GERSH (10) über eine enzymatische Liquefaktion pathologischer Spermaproben mit pankreatischer Dornase, die von ARMSTRONG und WHITE (2) zur Verflüssigung purulenten Sputums sowie von GLENN (11) zur Verflüssigung hypervisköser Sekrete von Urethra und Harnblase angewandt worden waren. GERSH konnte in nahezu allen Fällen eine schnelle und vollständige Wiederverflüssigung erreichen. Auffallend war, daß in 60 bis 70 Prozent der Fälle nach der enzymatischen Einwirkung eine verbesserte Spermatozoenmotilität resultierte.

Über eine enzymatische Liquefaktion von Primatensperma berichteten ROUSSELL und AUSTIN (29), wobei α -Chymo-Trypsin, Trypsin, Peptidase und β -Amylase sowie Pronase als Enzyme Verwendung fanden. Diese Versuche dienten dem Vergleich der Spermatozoenmotilität und -vitalität unbehandelter und enzymatisch liquifizierter Spermaproben von Primaten. Die Ergebnisse waren unterschiedlich. Überwiegend war jedoch bei der enzymatischen Liquefaktion die Spermamotilität verbessert.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen REZNICHEK, MANGESON, KADO und COCKETT (28). Sie publizierten 1968 vergleichende Untersuchungen an der Affenart *Macaca Nemestrina*, die beim amerikanischen Raumfahrtprogramm eingesetzt wurde.

EIGENE FRAGESTELLUNG

Ausgehend von diesen tier- und humanexperimentellen Untersuchungen wird in der vorliegenden Arbeit eine vergleichende Untersuchung über die Einwirkung von α -Amylase, Trypsin sowie Dornase auf Spermaproben fertiler Männer und Fertilitätsgestörter Patienten der andrologischen Sprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik Erlangen angestrebt.

Dabei sollen die spermatologischen Parameter von Verflüssigungszeit und Viskosität ebenso berücksichtigt werden wie das Motilitätsverhalten der Spermatozoen in den behandelten Proben. Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Beeinflussbarkeit von Agglomerationsphänomenen der Spermatozoen, d.h. klein- und großflächigen Anlagerungen von Spermatozoen, die sich bisher als wenig beeinflussbar erwiesen haben.

MATERIAL UND METHODEN

Untersucht wurden Spermaproben von 23 Männern. 11 waren gesund und fertil.

Das Sperma entsprach einer Normozoospermie. In 12 Fällen handelte es sich um sub- bzw. infertile Männer der andrologischen Sprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik Erlangen. Bei ihnen hatten spermatologische Untersuchungen pathologische Befunde ergeben, insbesondere verlängerte Wiederverflüssigungszeiten des Spermaoagulates und erhöhte Spermaviskositäten. Von diesen 23 Probanden wurden jeweils mehrere Spermaproben verwendet, so daß die Gesamtzahl der Untersuchungen 100 beträgt.

Das Sperma war bei einer durchgehenden Karenzzeit von 5 Tagen durch Masturbation in der Klinik gewonnen worden. Das Material wurde in einem sterilen, kalibrierten Standgefäß aufgefangen und anschließend untersucht. Dabei kamen folgende Meßreihen zur Durchführung:

1. Enzymatische Liquefaktion des koagulierten Spermas mittels Dornase, die unmittelbar nach Spermagewinnung zugefügt wurde. Das Zeitintervall betrug längstens 1 bis 2 Minuten. Verwendet wurde das Präparat DORNOVAC (pankreatische Dornase) der Firma MERCK, SHARP und DOHME. Entsprechend der Firmenanweisung wurden 100 000 Einheiten des lyophilisierten Puders in 2 ml 0,9 %iger Na-Cl-Lösung aufgelöst, die auf Körpertemperatur erwärmt war.

Sperma- und Enzymflüssigkeit wurden im Verhältnis 1 : 1 zusammengebracht.

Bestimmt wurde die Zeit der Verflüssigung, die resultierende Spermaviskosität in einer subjektiven Schätzmethode durch Eintauchen einer Platinöse und Herausziehen einer Flüssigkeitssäule. In Einzelfällen wurde zur exakten Bestimmung der Viskosität die von HORNSTEIN, HOFMANN und BAYER (3) benutzte Mikrorotationsviskosimetrie mit dem Brookfield-Viskosimeter Modell LVT angewendet.

Die Spermatozoenmotilität wurde zunächst quantitativ durch Auszählen von 300 Spermatozoen bestimmt. Weiterhin wurde der Anteil progressiv motiler Spermatozoen gemessen und klassifiziert.

Dabei bedeuten:

1/5 ganz vereinzelt gut,

1/4 vereinzelt gut,

1/3 spärlich gut,

1/2 gut bis pathologisch

3/4 überwiegend gut.

Zur Beurteilung des Motilitätsverlustes nach 2 Stunden erfolgte eine erneute Motilitätsbestimmung.

Agglomerationsphänomene wurden hinsichtlich der Anzahl (+ = vereinzelt, ++ = häufig, +++ = viel, ++++ = überwiegend) sowie die Flächenausdehnung (o = klein, oo = mittel, ooo = groß) beschrieben. Auch hier wurde sofort nach enzymatischer Liquefaktion und 2 Stunden danach gemessen. Da die gesamte Spermaprobe zur Untersuchung ge-

langte, wurde eine 5 Tage vorher gewonnene Probe als Nativwert herangezogen. Diese Untersuchung betraf die makroskopische Analyse hinsichtlich Verflüssigungszeit, Viskosität, ph, Farbe, Aussehen, Volumen; die mikroskopische hinsichtlich der Zellzahl und der Spermatozoenmotilität.

2. Zum Vergleich der Enzyme α -Amylase, Trypsin, Dornase konnte lediglich das bereits liquifizierte Sperma verwendet werden. Die Konzentration von α -Amylase betrug 125 E/ml, von Trypsin 2 E/mg (d.h. entsprechend einer 1%igen Lösung) sowie von Dornase 50 000 E/ml.

Da Dornase nach Firmenanweisung in Na-Cl-Lösung verwendet werden sollte, wurde dasselbe Lösungsmittel für die anderen Enzyme herangezogen. Wiederum wurden 1 ml Spermaflüssigkeit mit 1ml Enzymlösung versetzt. Der Untersuchungsgang entsprach dem oben genannten.

3. In der dritten Meßreihe wurden die genannten Enzyme in Ringerlösung und physiologischer Kochsalzlösung miteinander verglichen bei gleicher Konzentration der Enzyme; weiterhin wurde zur Bestimmung des Dilutionseffektes Nativpserma sowie Ringer bzw. Na-Cl-dilutiertes Sperma verglichen. Auch hier war der Untersuchungsgang wie oben beschrieben. Die Motilitätsbestimmungen wurden teilweise über 24 Stunden ausgedehnt.

Biochemische Erläuterungen:

α -Amylase: Verwendet wurde das aus Pankreas hergestellte Präparat der Firma Merck, das lyophilisiert ist und 320 Einheiten/mg enthält.

Bei der α -Amylase handelt es sich um α -1,4-glukan-4-glukano-Hydrolase, die Polysaccharide wie Amylose, Amylopectin und Glykogen sowie deren Abbauprodukte mit einer Kettenlänge von mindestens 3 D-glukose-Resten hydrolysiert. Die Spaltung der Polysaccharidketten geschieht nach dem Prinzip der "multiple attacks". Nach Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes kann das Enzym mehrere Bindungen des Polymeren hydrolysieren, bevor das Ferment wieder in freier Form vorliegt.

Trypsin: Als Präparat wurde ein vom Rind gewonnenes Ferment der Firma Merck genommen. Es ist lyophilisiert und enthält 2 Einheiten/mg. Das Enzym hydrolysiert Proteine, Peptide, Amide, Ester an den Karboxyl-Gruppen von L-Arginin oder L-Lysin. Das Wirkungsoptimum liegt bei pH 8,2.

Dornase^{*}: Es handelt sich um das Enzym Desoxy-ribo-nuclease I, das aus Rinderpankreas gewonnen wird. Das Ferment hydrolysiert hochpolymere, native und denaturierte DNA sowie Nucleotide. Lebende Zellen werden von Dornase nicht beeinflusst, lediglich Körpersekrete bzw. abgestorbene Zellen.

* Das Präparat wurde uns dankenswerterweise von der Firma Merck zur Verfügung gestellt.

Statistische Methoden:

Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte ($\bar{m}$) berechnet nach der Formel

$$\bar{m} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Zur Berechnung der Varianz diente die Formel

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{m})^2}{n - 1}$$

mit der die Standardabweichung

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{m})^2}{n - 1}}$$

bestimmt werden konnte.

ERGEBNISSE

1. Enzymatische Spermaliquefaktion unmittelbar nach der Ejakulation mit Dornase (50 000/ml NaCl).

1.1. Sperma-Wiederverflüssigungszeit und Viskosität.

Tabelle 1

Proben- nummer	Wiederverflüssi- gung (min)		Viskosität	
	nativ	nach Dornase- zugabe	nativ	nach Dorna- sezugabe
1	50	9	normal	wässrig
2	35	8	normal	wässrig
3	55	6	leicht vermehrt	wässrig
4	25	5	normal	wässrig
5	15	5	normal	wässrig
6	20	6	normal	wässrig
7	35	5	normal	wässrig
8	50	10	leicht vermehrt	wässrig
9	70	8	leicht vermehrt	wässrig
10	60	7	leicht vermehrt	wässrig

Beurteilung:

Die Dornase induzierte Verflüssigung des Spermaoagulates führte zu erheblich verkürzten Wiederverflüssigungszeiten. Der kürzeste Wert lag bei 5 Minuten, der längste bei 10 Minuten.

Die Verflüssigungszeiten der mit Dornase behandelten Proben waren im Schnitt auf 19,25 % verkürzt. In der statistischen Berechnung nach dem T-Test zeigt sich beim Vergleich der beiden Gruppen eine Signifikanz des Unterschieds von $p < 0,001$, was hochsignifikant ist. Während die Viskosität der Nativproben in 4 Fällen vermehrt und in 6 Fällen der Norm entsprochen hatte, war nach Dornase-Zugabe in allen Fällen eine wässrige Konsistenz gegeben. Mit der Platinöse ließ sich kein Faden ziehen.

Zur Überprüfung der mit der subjektiven Schätzmethode ermittelten Viskositätsbefunde wurden bei 5 Probanden exakte Bestimmungen der Spermaviskosität nach Dornase-Liquefaktion durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip einer Mikrorotationsviskosimetrie, die von HORNSTEIN, HOFMANN und BAYER (3) angewendet wurde. Gemessen wurde mit dem Brookfield-Viskosimeter, Modell LVT. Die Autoren ermittelten bei nicht vorbehandeltem Sperma einen Abfall der Spermaviskosität in einer Beobachtungszeit von über 5 Stunden.

Je nach Höhe des Ausgangswertes war der folgende Viskositätsverlust unterschiedlich stark. Erst nach 4 bis 5 Stunden war die Viskosität wässrig und entsprach den Bedingungen einer Newton'schen Flüssigkeit, d.h. es trat kein weiterer Viskositätsabfall mehr ein.

Bei den 5 mit Dornase behandelten Proben wurde die Viskosität unmittelbar nach der Enzym-induzierten Liquefaktion gemessen, weiterhin alle 5 Minuten über eine Distanz von

60 Minuten. Es ergaben sich stets die gleichen Viskositäts-
werte von 2 bzw. 3 centipoise. Damit war bewiesen, daß
durch Dornasezugabe eine vollständige Äquilibration der
Spermaviskosität erreicht worden war; sie war als wässrig
zu bezeichnen.

Tabelle 2: Spermatozoen-Motilität (% motile Spermatozoen) und Progressionsklassen im Nativ-Sperma sowie prozentuale Änderung der Spermatozoen-Motilität und Änderung der Spermatozoen-Progression in Klassenstufen nach Dornase-Liquefaktion.

Proben- nummer	Nativ-Sperma			Sperma nach Dornase-Zugabe		
	nach 1 Minute	Progres.- Klassen	Notili- tät	nach 1 Minute	Progres.- Klassen	Notili- tät
1	80	1/2	75	- 6 %	- 2	0 %
2	70	1/4	60	+28 %	+ 1	+33 %
3	60	1/4	55	+ 8 %	0	+27 %
4	75	3/4	70	+ 6 %	- 2	+ 7 %
5	70	1/4	70	+14 %	0	+14 %
6	75	1/4	70	- 7 %	+ 1	0 %
7	25	1/5	25	+100%	+ 1	+120%
8	50	1/3	35	+40 %	+ 1	+42 %
9	65	1/4	55	+ 8 %	- 1	+46 %
10	55	1/3	50	+36 %	+ 1	+59 %
						+ 2

Die Progressionsklassen sind in Stufen angegeben;
es bedeuten

ganz vereinzelt gut	1/5
vereinzelt gut	1/4
spärlich gut	1/3
gut bis pathologisch	1/2
überwiegend gut	3/4

In der Tabelle wurden die Motilität der Nativprobe sowie die nach 2 Stunden verbleibende Motilität berücksichtigt, weiterhin der Anteil progressiver Spermatozoen. Gegenüber den Ausgangswerten wurde die Änderung der quantitativen Motilität in % und die Änderung der Spermaprogression in Klassenstufen dargestellt.

Beurteilung:

In 7 von 10 Fällen war die vorgegebene Motilität normgerecht (mehr als 60%), in 2 Fällen geringgradig eingeschränkt (50 - 60 %), in einem Fall stark eingeschränkt (25 %). Der Motilitätsabfall lag in allen Fällen innerhalb der Norm (maximal 15 % des Ausgangswertes). Die quantitative Spermatozoenmotilität der mit Dornase liquifizierten Proben war in 8 von 10 Fällen überlegen. Dabei erstreckte sich der Motilitätszuwachs im Bereich von 8 bis 100 %. Der größte Motilitätszuwachs von 100 Prozent wurde in einer Probe mit vorgegebener starker Motilitätsminderung ermittelt. Lediglich in 2 Proben fand sich gegenüber dem Nativwert eine

Verschlechterung der quantitativen Motilität um 6 % bzw. 7 %.

Ein vergleichbares Verhalten wurde bei den Messungen nach 2 Stunden ermittelt. Der Zuwachs betrug zwischen 14 % und 120 %. Auch hier wurde eine optimale Besserung bei der vorgegebenen schlechten Spermatozoenmotilität ermittelt.

In der statistischen Berechnung der quantitativen Spermatozoenmotilität zeigte das Nativ-Sperma folgende Werte: Mittelwert 61,4 %; Standardabweichung 15,7353; $n = 10$.

Das Dornase liquiefizierte Sperma ergab dagegen folgende Werte:

Mittelwert 71,5 %; Standardabweichung 10,6588; $n = 10$

Im T-Test ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit des Unterschiedes von $p = 0,1$. Die Tendenz einer verbesserten Spermatozoenmotilität ist deutlich. Wegen der starken Streuung vom Mittelwert und der geringen Fallzahl ist Signifikanz des Unterschiedes noch nicht gegeben.

In der Berechnung des Motilitätsverlustes nach 2 Stunden (d.h. der Stabilität) wurden folgende Werte ermittelt:

Im Nativ-Sperma ein Mittelwert des prozentualen Motilitätsverlustes von 9,67 %; $s = 8,73$; $n = 10$;

bei der Dornase-liquiefizierten Gruppe ergab sich der Mittelwert des prozentualen Motilitätsverlustes 1 %; $s = 12,45$; $n = 10$.

Die T-Test-Berechnung zeigt eine Signifikanz des Unterschiedes von $p < 0,05$.

Die Motilitätsverbesserung nach Dornase-Liquefaktion des Spermas ist in der Tendenz eindeutig und in der Spermatozoenmotilität sogar signifikant.

In der Einzelanalyse fanden sich eindeutig die stärksten Zuwachsraten der Motilität bei den Fällen von Asthenozoospermie.

In der Spermatozoen-Progression wurden 5 Fälle einer Besserung nach Dornase-Behandlung um jeweils 1 Progressionsklasse gesehen; 2 Fälle waren unverändert; 3 Fälle waren verschlechtert, dabei 2 um zwei Klassen. Ähnlich verhielt sich die Progressionsrate nach 2 Stunden.

Auffallend war jedoch, daß in 5 Fällen von 10 ausgeprägte hyperkinetische Bewegungsabläufe gesehen wurden, die auch nach 2 Stunden noch nachweisbar waren. Die Spermatozoen zeigten eine sehr hohe Schlagfrequenz, die sich jedoch nicht in einer kontinuierlichen Progression ausprägte; die Bewegungsabläufe waren vorwärts gerichtet, jedoch dabei zuckend. Derartige Bewegungsabläufe wurden in der Klassifikation nicht berücksichtigt, da mit einer verfrühten Bewegungser-schöpfung gerechnet werden mußte.

1.3. Spermatozoen-Agglomerationen in der Nativprobe, der Dornase-liquefizierten Probe unmittelbar nach der Wiederverflüssigung und 2 Stunden danach.

Erklärung der Zeichen:

Agglomerationen	+	bedeutet	vereinzelt
	++		häufig
	+++		viel
	++++		überwiegend

Flächenausdehnung der Agglomerationen

o	bedeutet	klein
oo		mittel
ooo		groß

Tabelle 3

Proben- nummer	nativ	nach Dornase- zugabe	2 Std. nach Dornasezugabe
1	-	+ o	+ o
2	-	-	-
3	-	-	-
4	++ o	++ o	++ o
5	+ o	+++ o ooo	++ o ooo
6	+ o	+ o	+ o
7	+ o	-	-
8	-	+ oo	+ o
9	-	++ o oo	++ oo ooo
10	-	-	-

Beurteilung:

Eine Zunahme der Agglomerationsphänomene hinsichtlich Anzahl und Ausdehnung wurde in einem Fall beobachtet. Neuauftreten von Agglomerationsphänomenen wurde in 2 Fällen geringgradig, in 1 Fall mittelgradig festgestellt, während in 1 Fall die Agglomeration aufgelöst wurde.

2.1. Enzymatische Beeinflussung des Spermas mit α -Amylase (125 E/ml), Trypsin (2 E/mg), Dornase (50 000 E/ml) in physiologischer Na-Cl-Lösung nach Eintritt der Wiederverflüssigung.

Die Spermaviskosität war in allen Proben nach Zugabe der Enzyme von wässriger Konsistenz. Dieser Befund war ohne Ausnahme gegeben. Zur Analyse des Verhaltens der Spermatozoen wurde wiederum die Motilität herangezogen. (Tabelle 4)

Beurteilung:

Das vorgegebene Material dieser Serie wies Wiederverflüssigungszeiten auf, die meist im oberen Normbereich lagen oder aber geringfügig erhöht waren. Die Viskosität war in einem Fall erhöht. Die quantitative Motilität lag im Normbereich; der Motilitätsabfall war in allen Fällen gering. Lediglich die Spermienprogression wies in 4 Fällen eine Einschränkung auf.

Nach Zugabe von α -Amylase und Trypsin war die resultierende Viskosität wenig verändert, nach Zugabe von Dornase jedoch reduziert.

Die Zugabe von α -Amylase führte in 4 Fällen zu einer Einschränkung der quantitativen Spermatozoenbeweglichkeit sowohl initial als auch nach 2 Stunden. Nur in einem Fall wurde keine Änderung gesehen. Der Beweglichkeitsabfall betrug maximal 17 %. Hinsichtlich der Spermienprogression wurde lediglich in einem Fall eine Verbesserung um 1 Stufe gesehen. Ansonsten war der Befund entweder gleich oder bis zu 3 Stufen eingeschränkt.

Tabelle 4: Quantitative Spermatozoenmotilität und Progressionsklassen sowie prozentuale Änderung der quantitativen Motilität und Änderung der Progressionsstufen nach Enzymbehandlung; Sofort-Wert und 2-Stunden-Wert.

Proben- nummer	Motilität nach Wiederverflüssigung				Motilität nach 2 Stunden			
	nativ	α -Amylase	Trypsin	Dornase	nativ	α -Amylase	Trypsin	Dornase
14	85 1/3	-12%	-12%	-6%	75 1/3	-7%	0%	+6%
15	80 1/4	-7%	-7	0	75 1/4	-7	+6%	0
16	60 1/4	-9%	-9	+1	60 1/5	-17	0	+8
17	75 3/4	-14	-14	+7	70 3/4	-7	-20	-14
18	65 1/3	0	+6	0	60 1/3	0	+17	+8

Trypsin führte ebenfalls in 4 Fällen initial zu einem Beweglichkeitsabfall, der bei 4 Fällen von 7 bis 14 % reichte. Bei der 2-Stunden-Messung wurde einmal ein Abfall bis zu 20 % festgestellt, zweimal eine Besserung bis zu 17 % und zweimal kein Unterschied zum Nativwert.

Die Spermienprogression wurde meist unverändert vorgefunden. In einem Fall war sie reduziert.

Dornase-Zugabe führte initial in 2 Fällen zu einer Minderung der quantitativen Motilität, in einem Fall zu einer Steigerung. Nach 2 Stunden veränderte sich das Bild: In vier Fällen war eine Steigerung gegenüber einem Fall einer Minderung festzustellen. Hinsichtlich der qualitativen Bewertung wurden gleich viele Fälle einer Verbesserung wie einer Verschlechterung beobachtet. Auffallend wiederum war der Ablauf der hyperkinetischen Bewegung; besonders nach 2 Stunden war sie massiv ausgeprägt.

Die statistische Berechnung ergab folgende Mittelwerte und Standardabweichungen bei gegebener Fallzahl:

Tabelle 5

	$\bar{m}$	s	n
nativ	28,8	9,6798	5
Alpha-Amylase	33,4	7,4699	5
Trypsin	32,2	7,9246	5
Dornase	26,4	11,2160	5

Bei Vergleich der Spermatozoenmotilität der mit α -Amylase behandelten Probe wurde eine Verschlechterung gefunden mit

$p = 0,4$, ebenso bei Trypsin mit $p = 0,5$. Die Dornase-behandelte Probe zeigte gegenüber der Nativprobe eine geringe Besserung der Motilität. Bei $p = 0,8$ war jedoch hier eine Signifikanz nicht gegeben.

Für den prozentualen Motilitätsverlust nach 2 Stunden ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 6

	$\bar{m}$	s	n
nativ	8,48	6,62	5
α -Amylase	8,03	6,37	5
Trypsin	0,4	10,47	5
Dornase	0,13	13,03	5

Auch hier war Signifikanz nicht gegeben, wenngleich sich gegenüber den Nativproben die Trypsin- und Dornase-behandelten Proben in der Stabilität der Motilität in der Tendenz als besser darstellten.

2.2. Spermatozoen-Agglomerationen unmittelbar nach der Wiederverflüssigung und 2 Stunden danach bei den Nativproben und bei den mit α -Amylase, Trypsin und Dornase behandelten Proben.

Tabelle 7

Proben- nummer	Agglomerationen nach Wiederverflüssigung				Agglomerationen 2 Stunden danach		
	nativ	α -Amylase	Trypsin	Dornase	α -Amylase	Trypsin	Dornase
14	+ +++ o oo	+ o	+ o	+ o	++ o	+ o	+ o
15	+ o	+ o	-	-	+ o	-	+ o
16	+ o	+ ooo	-	+ o	++ ooo	-	+ o
17	++ o	+++ o	-	+++ oo	+++ o	+++ o	++++ oo
18	-	+ o	+ o	+ o	++ oo	-	++ o

Beurteilung:

AGGLOMERATIONSPHÄNOMENE waren bei 4 Fällen in Anzahl und Ausdehnung zum Teil beträchtlich im Nativ-Wert vorgegeben. Diese wurden in nahezu unveränderter Form bei Zugabe von α -Amylase auch nach 2 Stunden beobachtet.

Genauso verhielten sich die Proben bei Dornase-Zugabe, während bei Trypsin-Zugabe eine Minderung bzw. eine Auflösung derartiger Phänomene in 3 Fällen gesehen wurde.

In einem Fall waren Agglomerationsphänomene nicht vorgegeben. Sie wurden nach α -Amylase- und Dornase-Behandlung gefunden. Dagegen ließen sich bei Trypsin-Zugabe initial

lediglich wenige Phänomene erkennen.

3. Dilutionseffekt durch Zugabe von Ringer-Lösung zu den liquifizierten Spermaproben.

3.1. Ringerlösung wurde in gleichen Volumenanteilen wie die erwähnten Enzymlösungen zu den Spermaproben hinzugegeben, um den durch reine Verdünnung hervorgerufenen Effekt der Motilitätsbeeinflussung festzustellen. Dabei wurden Messungen bis über 24 Stunden durchgeführt. Folgende Befunde wurden ermittelt:

Tabelle 8

Proben- nummer	nativ								nativ + Ringer							
	0	2	8	24					0	2	8	24				
19	70	1/4 65	1/3						-1	+2	-14	+1				
20	65	1/3 65	1/3						+8	+2	+22	+1				
21	70	1/3 60	1/3						+7	0	+14	-2				
22	65	1/5 45	1/5						+8	+1	+22	0				
23	70	1/4 65	1/4						-7	0	-16	0				
24	75	1/3 70	1/3						+6	-2	0	-1				
25	75	1/2 75	1/2 65	1/4 0	-	0	-	0	-2	+7	-2	+22	0	0	-	
26	75	1/2 70	1/2 65	1/2 35	1/5	+6	-2	+14	-2	-8	-2	+42	-			
27	60	1/3 55	1/3 25	-	0	-	+10	0	+28	-1	+280	-	0	-		
28	75	1/4 80	1/4 80	1/4 45	1/4 0	-1	-6	-1	-25	0	0	-				
29	60	1/3 60	1/4 50	1/5 20	1/5	+25	+1	0	+2	+10	+2	+25	-			

Beurteilung:

In 7 von 11 Fällen zeigte sich unmittelbar nach Zugabe der Ringerlösung eine Motilitätsverbesserung, die sich in 6 Fällen auch nach 2 Stunden nachweisen ließ. In 2 Fällen war

eine Verschlechterung festzustellen. 2 weitere blieben unbeeinflusst. Nach 2 Stunden zeigten diese letztgenannten 4 Proben in 3 Fällen eine Verschlechterung.

5 Proben wurden nach 8 Stunden erneut analysiert. Dabei zeigten 3 noch eine Verbesserung, 2 dagegen eine Verschlechterung. Hinsichtlich der Progression war eine Verbesserung initial lediglich in 4 von 11 Fällen festzustellen; nach 2 Stunden in 3 von 11 Fällen. Die übrigen Proben zeigten meist eine Verschlechterung. Somit führte Zugabe von Ringerlösung zwar zu einer Verbesserung der quantitativen Motilität, nicht jedoch zur Besserung der Spermatozoenprogression.

In der statistischen Berechnung ergab sich folgendes Verhalten für initiale Werte:

Tabelle 9

	$\bar{m}$	s	n
nativ	31,28	5,6765	11
Ringer	28,73	6,3576	11

Signifikanz des Unterschieds war bei $p = 0,3$ nicht gegeben.

3.2. In der nachfolgenden Zusammenstellung wird ein Vergleich der enzymatisch behandelten Spermaproben mit den Nativ-Spermaproben gebracht, die in gleichen Volumenverhältnissen lediglich mit Ringerlösung verdünnt worden waren.

Ringerlösung wurde deswegen gewählt, um die Enzymlösungen zu optimaler Wirkung gelangen zu lassen. Dabei wurden folgende Ergebnisse ermittelt: s. Tabelle 10, S. 29

Tabelle 10

Proben- nummern	nativ + Ringer			α -Amylase				
	0	2	8	24Std.	0	2	8	24 Std.
19	65 1/4	60 1/4			-14	0 0 0		
20	70 3/4	80 1/2			0	- +8 -		
21	75 1/3	80 1/3			0	- -17 -		
22	70 1/4	55 1/5			+15	+1 +56 +1		
23	65 1/4	55 1/4			-29	-1 -38 -1		
24	80 1/5	70 1/4			-47	-2 -36 -2		
25	75 1/4	80 1/4	80 1/4	45 1/5	-13	-2 0 -2	+23 +1	
26	80 1/4	80 1/4	60 1/4	50 1/5	-13	-1 -14 -1	-23 0 -29	
27	70 1/4	65 1/4	65 1/4	30 1/5	-25	-2 -18 -2	-200 -	
28	75 1/5	75 1/5	60 1/5	60 1/5	- 6	0 -19 0	-20 -1 -11 -1	
29	75 1/2	60 1/4	55 1/4	25	- 8	0 0 +1	+30 +2 -50	

Beurteilung:

Entsprechend den im vorhergehenden Kapitel erzielten Ergebnissen fand sich auch hier bei α -Amylase-Zugabe eine deutliche Verschlechterung der Spermatozoenmotilität sowohl in der Quantität als auch in der Progression; in 8 von 11 Fällen war die quantitative Motilität verschlechtert, in 2 Fällen gleichbleibend, in 1 Fall verbessert.

Bei Zugabe von Trypsin wurde in 5 Fällen eine Verschlechterung der quantitativen Motilität gesehen; in 2 Fällen blieb sie gleich, in 4 Fällen war sie verbessert.

Bei Dornase-Zugabe war dagegen in 5 von 8 Fällen eine Verbesserung eingetreten; lediglich in 3 Fällen war eine Verschlechterung festzustellen. Dieses Verhalten zeigte sich entsprechend in der weiteren Zeitbeobachtung bis über 24 Stunden.

In der statistischen Auswertung ergaben sich für die Initialwerte folgende Ergebnisse:

Tabelle 11

	$\bar{m}$	s	n
nativ	28,73	6,3576	11
α -Amylase	40,37	10,0825	11
Trypsin	32,82	8,9646	11
Dornase	35,50	10,3785	8

Die Signifikanzen der Initialwerte von Nativsperma, die zu den mit Enzymen in Ringerlösung versetzten Sperma in

Beziehung gesetzt wurden, ergaben:

Tabelle 12

nativ: α -Amylase	p = 0,02
nativ: Trypsin	p = 0,65
nativ: Dornase	p = 0,3

Eine Signifikanz des Unterschieds war bei nativ:

α -Amylase gegeben, d.h. α -Amylase war schlechter in der Stabilität als das Nativsperma.

Bei Trypsin und Dornase, in Beziehung zum Nativ-Sperma gesetzt, war keine Signifikanz des Unterschieds gegeben.

3.3. Zum Vergleich der Dornase-Einwirkung in der vorgeschriebenen physiologischen Na-Cl-Lösung und der Dornase-wirkung in Ringer-Lösung wurden 8 Spermaproben behandelt. Dabei wurden folgende Befunde ermittelt: s. Tabelle 13

Tabelle 13

Proben- nummer	nativ		24Std.	Dornase + Ringer			Dornase + Na-Cl																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	0	2		8	0	2	8	0	2	8	24																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
22	65	1/5	45	1/5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						

Beurteilung:

Bei Zugabe von Dornase, gelöst in Ringerlösung bei gleichen Volumenanteilen, nach Eintritt der physiologischen Wiederverflüssigung zeigte sich in 5 von 8 Fällen eine Besserung der quantitativen Motilität der Spermatozoen. In 3 Fällen verschlechterte sie sich. In der weiteren Zeitbeobachtung nach 2 Stunden war nur noch bei 3 Proben eine Verbesserung gegenüber dem Nativsperma festzustellen. Die anderen 5 Proben fielen in der quantitativen Motilität weiter ab. Diese Tendenz blieb bei der Beobachtung über 24 Stunden erhalten. Die Progression der Spermatozoen besserte sich bei den mit Dornase in oben angegebenen Verfahren behandelten Proben in 50 % der Fälle. Die Besserung blieb im weiteren Verlauf der Untersuchungen nicht erhalten.

Bei dem mit Dornase in 0,9%iger Na-Cl-Lösung versetztem Sperma besserte sich die Motilität initial in 25 % der Fälle. Die Spermatozoenprogression besserte sich ebenfalls nur in 2 von 8 Fällen. Analog zu dem oben beschriebenen Versuch, bei dem Sperma mit Dornase in Ringer-Milieu behandelt wurde, war auch bei dieser Versuchsanordnung keine Tendenz einer Besserung der Spermatozoen in quantitativer und qualitativer Hinsicht zu ersehen. Nach 24 Stunden war bei 4 von 5 Proben eine exakte Messung nicht mehr möglich gewesen.

Der Vergleich von physiologisch verflüssigendem Sperma mit Proben, die mit Dornase in Ringer- und Na-Cl-Milieu versetzt worden waren, bestätigte die in den vorhergehenden Abschnitten

dargelegten Beobachtungen.

In der statistischen Auswertung ergaben sich für die Initialwerte folgende Ergebnisse:

Tabelle 14

	$\bar{m}$	s	n
nativ	31,2828	5,6765	8
Dornase + Ringer	35,5000	10,3785	8
Dornase + Na-Cl	33,1010	7,0354	8

Eine Signifikanz des Unterschieds war bei Nativsperma zu dem mit Dornase in Ringer behandelten Sperma bei $p = 0,3$ nicht gegeben; ebenso wie bei Nativsperma in Beziehung zu dem mit Dornase in physiologischer Na-Cl-Lösung gebrachten Sperma bei $p = 0,6$.

3.4. Darstellung der Agglomerationsphänomene bei Nativsperma und bei mit Enzym behandeltem Sperma über eine Zeitbeobachtung von 24 Stunden. Lösungsmittel war Ringer- und physiologische Kochsalzkösung.

Tabelle 15

Probe	nativ				nativ + Ringer				α -Amylase + Ringer			
	0	2	8	24	0	2	8	24	0	2	8	24
19	+	+	0	+	+++ 0	+++ 0	+++ 000	+++ 000	+++ 0	+++ 000/0	+++ 000	+++ 0000
20	+	+	0	+	+	+	-	+	+	+	+	+
21	+	+	0	+	++ 0	+	-	++ 0	-	++ 0	0	++ 0/00/000
22	-	-	-	-	!	-	-	-	+	0	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	-	-
24	+	+	-	-	!	-	-	-	+++ 00	++ 00	-	-
25	-	!	++ 0 00	-	!	-	-	-	+	-	+++ 000	-
26	++ 0	+	-	++ 00	!	!	-	-	+++ 000	+++ 000	+++ 000	++ 00
27	+	-	++ 00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	+++ 00000	+++ 000	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++ 0/00

! bedeutet hyperkinetisch

Probe	Trypsin + Ringer				Dornase + Ringer				Dornase + Na-Cl			
	0	2	8	24	0	2	8	24	0	2	8	24
19	++	++	+	-	+++				+++ o	-		
20	+	o	-	-	++				o	!!		
21	-	-	+	o	o				o	!!		
22	-	-	-	-	++				o	!!		
23	-	-	-	-	o/oo/ooo				o/oo/ooo			
24	-	-	-	-	-				-			
25	++ o	-	-	-	+++ oo				+++ oo/ooo	+++ oo/ooo		
26	-	-	-	-	+				+	o/oo		
27	-	-	-	-	+				!	-		
28	-	-	+	o	!!				+++ ooo	-		
29	-	-	-	-	!				+	o		

!! bedeutet stark hyperkinetisch

Beurteilung

Im Untersuchungsgang wurde auf eine mögliche Beeinflussung von Agglomerationsphänomenen der Spermatozoen durch Enzymzugabe geachtet. Insgesamt mußte festgestellt werden, daß sich Agglomerationsphänomene durch Zugabe von Enzymen nicht entscheidend beeinflussen lassen. Lediglich nach Trypsinzugabe wurden weniger Agglomerationsphänomene gesehen, während α -Amylase eher zu einer Provokation von Agglomerationsphänomenen führte. D.h. Agglomerationsphänomene nahmen an Zahl und Ausdehnung, verglichen mit der Nativprobe, zu. Ein geringer Zuwachs war auch bei Behandlung mit Dornase gegeben.

Diese Beobachtungen sind insofern interessant, als bei enzymatischer Änderung der Spermaviskosität sich durchaus nicht die Agglomerationen auflösten; man kann daraus schließen, daß die Agglomerationsphänomene nicht durch eine bloße Viskositätssteigerung des Spermaplasmas bedingt sind.

DISKUSSION

Bei der Spermakoagulation und -verflüssigung handelt es sich nach den Untersuchungen von LUNDQUIST (21), RASMUSSEN (27) sowie MANN (22) um enzymatisch gesteuerte physiko-chemische Proteinveränderungen.

BUNGE, SHERMAN (7) sowie GERSCH (10) berichteten über enzymatische Verflüssigungen des Spermakoagulates mit Amylase bzw. Dornase. Amylase ist ein glykolytisches Ferment, Dornase eine Nucleotidase.

Es war überzeugend zum Ausdruck gekommen, daß sowohl mit Amylase als mit Dornase eine Liquefaktion des noch nicht verflüssigten Spermakoagulates erreicht werden konnte. Demnach würde es sich bei der Liquefaktion nicht nur um einen bloßen proteolytischen bzw. fibrinolytischen Vorgang handeln, sondern nach den Ergebnissen der oben zitierten Versuche auch um eine enzymatische Spaltung von Polysacchariden bzw. Polysaccharid-Nucleotid-Verbindungen. Ein derartiger Befund würde mit den biologischen Gegebenheiten insofern übereinstimmen, als im weiblichen Cervikalsekret besonders in der prä-ovulatorischen Phase Amylase nachgewiesen werden kann.

Soweit bisher übersichtlich, sind weitere experimentelle Untersuchungen bisher nicht durchgeführt worden, die über diesen Aspekt der Spermaliquefaktion weitere Aufschlüsselungen geben könnten. Dagegen sind Untersuchungen mit proteolytischen Fermenten wie Trypsin und Chymotrypsin bei Primaten

durchgeführt worden. Dabei leitete man unmittelbar nach der Ejakulation die Liquefaktion artifiziell enzymatisch ein. Wie die Untersuchungen von AUSTIN (29) zeigen, war die resultierende Motilität der Spermatozoen gegenüber der physiologisch verflüssigten Probe sogar verbessert. MAUSS (23) hat die Trypsinliquefaktion angewendet bei nicht verflüssigten Spermaproben zur Zählung der Spermatozoenanzahl. Die Trypsinkonzentration war hoch gewählt worden; auf die physiologischen Bedingungen der Motilität brauchte hierbei keine Rücksicht genommen zu werden.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten sich zum Ziel gesetzt, eine Spermaliquefaktion artifiziell durch Dornasezugabe zu bewirken und dabei das Motilitätsverhalten der Spermatozoen zu beurteilen. GERSH(10) hatte in seinen Versuchen eine beträchtliche Motilitätssteigerung durch Dornase-Liquefaktion erzielen können. Diese seine Untersuchungen wurden bei den vorliegenden Experimenten dahingehend modifiziert, daß die Enzymzugabe unmittelbar nach der Ejakulation erfolgte, somit die Liquefaktion artifiziell enzymatisch herbeigeführt wurde.

Dornase in einer Konzentration von 50 000 E/ml 0,9%iger Na-Cl-Lösung/ml Sperma führte zu einer unmittelbar sichtbaren Verflüssigung des Spermakoagulates. Die resultierende Viskosität war, verglichen mit der Viskosität der Nativprobe,

deutlich herabgesetzt. Sie war annähernd wässrig und verhielt sich bei der Mikro-Rotations-Viskosimetrie wie bei Spermaproben, die 4 bis 5 Stunden dem natürlichen Verflüssigungsprozeß und Abbau unterworfen waren. Hinsichtlich der Motilität konnten wir die Ergebnisse von GERSH bestätigen. Im T-Test ließ sich zwar wegen der geringen Fallzahl und der hohen Streuung eine Signifikanz nicht sichern ($p = 0,1$); dagegen zeigte sich aber im T-Test eine Signifikanz des Unterschieds in der Stabilität der Motilität über 2 Stunden.

Hinsichtlich der Spermatozoenprogression war ebenfalls eine Besserung festzustellen. Dabei fiel auf, daß häufig hyperkinetische Bewegungsabläufe induziert worden waren, d.h. Bewegungsabläufe der Spermatozoen mit sehr hoher Schlagfrequenz und teilweise koordiniert-paralleler Fortbewegung.

In der Interpretation dieser Befunde ist man zunächst geneigt, die veränderte Viskosität als Ursache der Motilitätssteigerung anzusehen. Andererseits muß darauf hingewiesen werden, daß auch im menschlichen Sperma ein "nucleolytisches Enzym-System" (P.SANTIANNI, G. ARCENZIANO 31) gegeben ist. Teils *intra*-, teils extrazellulär, ist es für die Spermatozoenmotilität von Bedeutung. Es kann durchaus sein, daß Dornase als Nucleotidase zur Spaltung von Energieträgern führt, die den Metabolismus der Spermatozoen beeinflussen.

In einer 2. Versuchsreihe wurde ein Vergleich der von α -Amylase, Trypsin und Dornase induzierten Liquefaktion angestrebt. Zusätzlich wurden Versuche mit Dornase in Ringer-Lösung und in physiologischer Kochsalzlösung deswegen durchgeführt, weil nach Angaben der Herstellerfirma 0,9%ige Na-Cl-Lösung zur Lösung von Dornase vorgeschrieben war. Da diese Versuche mehrstufig waren, konnte nicht mehr das unverflüssigte Sperma benutzt werden. Es wurde nach Verflüssigung und Durchmischung in verschiedenen Volumanteilen zur Anwendung gebracht. Dabei zeigte sich, daß das Lösungsmittel (physiologische Na-Cl-vice versa Ringer-Lösung) keine Bedeutung hat. Viskositätsänderung konnte mit allen 3 Enzymen erreicht werden; am schnellsten mit Dornase, gefolgt von Trypsin und Amylase in den oben genannten Konzentrationen. Bei genügender Zeitbeobachtung war in allen Fällen die resultierende Viskosität wässrig. Hinsichtlich der Spermatozoenmotilität zeigte Dornase die besten Ergebnisse, gefolgt von Trypsin und α -Amylase. Insgesamt war die Motilitätssteigerung jedoch gegenüber der 1. Versuchsreihe, mit Dornase-induzierter Liquefaktion, jedoch gering. In einzelnen Fällen wurde auch eine Verschlechterung gesehen.

Vergleicht man die Enzymzugabe mit der Zugabe des bloßen Lösungsmittels, d.h. Ringerlösung, so ergibt sich, daß die mit Ringer behandelten Proben visköser sind als die mit Enzym behandelten. Die Motilität war bei Zugabe von Ringerlösung im

Sinne des Dilutionseffektes gesteigert, in der weiteren Zeitbeobachtung stärker abfallend. Vergleicht man den Dilutionseffekt mit dem Effekt der Enzymbehandelten und via Lösungsmittel dilutierten Proben, so zeigte sich anfänglich kein Unterschied. Nur in der weiteren Zeitbeobachtung waren die Enzym behandelten Proben stabiler.

Somit läßt sich zusammenfassen, daß ein optimales Ergebnis hinsichtlich der Liquefaktion und Sperma-Viskosität durch unmittelbare Zugabe von Dornase zum koagulierten Sperma erreicht werden konnte. Dabei wurde eine deutliche Steigerung der Spermatozoenmotilität erreicht. Zugabe von α -Amylase, Trypsin bzw. Dornase zu bereits verflüssigtem Sperma führte zwar ebenso zu einer Beeinflussung der Spermaviskosität; verglichen mit einer isotonischen Ringerlösung (Dilution) war die Spermatozoenmotilität jedoch nicht verbessert. Lediglich in der Stabilität wurde hier eine Beeinflussung im positiven Sinn gesehen.

Im Zuge dieser Untersuchungen stellte sich gleichzeitig die Frage, ob Agglomerationsphänomene durch Enzymwirkung zu beeinflussen sind. Wie in der Einleitung ausgeführt, werden Agglomerationsphänomene häufig beobachtet, insbesondere bei Patienten mit spastisch-vegetativen Durchblutungsstörungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie mit Entzündungen. Bei den Agglomerationsphänomenen handelt es sich um Anlage-

rungen von Spermatozoen aneinander, die kein Lokalisationsgesetz wie Kopf-Kopf, Schwanz-Schwanz, Kopf-Schwanz aufweisen, so wie das bei immunologischen Reaktionen gesehen wird. Bisher ist nicht klar, wodurch diese Agglomerationsphänomene ausgelöst werden, worin sie physikalisch-chemisch bestehen und wie sie beeinflusst werden können. Aufgrund der durchgeführten Enzymuntersuchungen müssen wir feststellen, daß durch enzymatische Liquefaktion des Spermas Agglomerationen nicht verhütet werden können.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Dornase in einer Konzentration von 50 000 E/ml 0,9%iger Na-Cl-Lösung/ml Sperma verflüssigt das frische menschliche Spermaokoagulat sofort. Bei 10 Proben ließ sich im Mittel eine Verkürzung der physiologischen Wiederverflüssigungszeit um das Fünffache erreichen.
2. Die resultierende Viskosität des Spermaplasmas nach enzymatischer Liquefaktion ist wässrig. Sie kann mit der Viskosität nach physiologischer Verflüssigung im Zeitintervall von 4 bis 5 Stunden verglichen werden. Während sich bei der physiologischen Spermaverflüssigung die Viskosität in den ersten Stunden weiter vermindert und erst nach 4 bis 5 Stunden eine stabile, wässrige Konsistenz aufweist, die den Bedingungen einer Newton'schen Flüssigkeit entspricht, sind diese Eigenschaften des Spermaplasmas bei enzymatischer Liquefaktion sofort festzustellen. Diese Untersuchungen wurden an 5 Proben mit Hilfe der Mikro-Rotations-Viskosimetrie bestätigt.
3. Die Sperma-Viskosität läßt sich nach der physiologischen Wiederverflüssigung gleichfalls durch Dornase beeinflussen. Das Ausmaß der Beeinflussung ist jedoch geringer als bei unmittelbarer Zugabe von Enzym zum Koagulat.

4. Verglichen mit α -Amylase in einer Konzentration von 125 E/ml und 1%iger Trypsin-Lösung in Ringer bzw. physiologischer Na-Cl-Lösung /ml zeigt Dornase eine bessere Beeinflussung der Viskosität.
5. Die Zugabe dieser Enzyme führt zu keiner Schädigung der Spermatozoenmotilität. Vielmehr wird nach Dornase-Zugabe eine schnellere Schlagfrequenz des Spermaflagellums gesehen, wodurch sich die Geschwindigkeit der Spermatozoen vergrößert. Dieser Effekt ist nicht in gleichem Ausmaß bei Trypsin und α -Amylase beobachtet worden. Die Interpretation des Phänomens ist nicht eindeutig. Zusatzuntersuchungen mit Zugabe der gleichen Volumenanteile lediglich des Lösungsmittels führten im Dilutionseffekt zunächst zu einer Steigerung der Spermatozoenmotilität, die größer war als bei Zugabe der Enzymlösung. Im weiteren Verlauf aber fiel die Motilität der Spermatozoen in der reinen Dilutionsprobe stärker ab als bei den mit Enzym versetzten Proben. Mögliche Mechanismen der Dornasewirkung im Nucleotid-Stoffwechsel der Spermatozoen werden diskutiert.
6. Die Motilitätssteigerung wurde in den Untersuchungen sowohl nach 2 als auch nach 24 Stunden festgestellt; das quantitative Ausmaß war dabei unterschiedlich. In wenigen Fällen mußte eine verschlechterte Motilität registriert werden, was bei Amylase- und Trypsinzugabe häufiger war.

Aufgrund dieser Untersuchungen wird der besonders günstige Effekt einer Dornase-Liquefaktion des Sperma herausgestellt. D.h. es wird eine beschleunigte bzw. vollständige Verflüssigung des Sperma-Koagulates erreicht sowie eine Minderung der erhöhten bzw. normalen Spermaviskosität. Gleichzeitig korrespondiert damit eine Verbesserung der Spermatozoenmotilität.

7. Agglomerationsphänomene der Spermatozoen lassen sich durch enzymatische Liquefaktion bzw. Beeinflussung nicht auflösen. Lediglich Trypsin in der oben angegebenen Konzentration führt zu einer geringen, jedoch nicht eindeutigen Auflösung der Agglomerationsphänomene, während eine Verstärkung bei α -Amylase und weniger bei Dornase beobachtet wird.

LITERATUR

1. AMELAR, D.: Coagulation, liquefaction and viscosity of human serum.
J. Urol. 87, 187-190 (1962)
2. ARMSTRONG, J.B.; J.C. WHITE: Liquefaction of viscous exsudates by desoxyribonuclease.
Lancet 2, 739 (1950)
3. BAYER, H.H.: Untersuchungen der Viscosität path. menschlicher Spermien mit Hilfe der Rotationsviscosimetrie.
Diss. Erlangen 1972
4. BERGMAYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse.
Weinheim: Verlag Chemie 1970
5. BISHOP, D.W.: Sperm motility.
Physiol. Rev. 42, 1-59 (1962)
6. BUNGE, R.G.: Some observations on the male ejaculate.
Fert. and Steril. 21, 639-644 (1970)
7. BUNGE, R.G., J.K.SHERMAN: Liquefaction of human semen by α -amylase.
Fert. Steril. 5, 353-356 (1954)
8. DOKUMENTA Geigy: Wissenschaftliche Tabellen.
6. Auflage 1960, S. 32
9. ELIASSON, R.: Biochemical analyses of human semen in the study of the physiology and pathophysiology of the male accessory genital glands.
Fertil.Steril. 19, 344-350 (1968)

10. GERSH, I.: Pancreatic dornase for liquefaction of viscid human semen.
Fertil. Steril. 21, 147-150 (1970)
11. GLENN, J.F.: Urologic uses of pancreatic dornase: preliminary clinical trial.
J. Urol. 83, 485 (1960)
12. GRAY, J.: Sperm motility.
J. Exper. Biol. 35, 96 (1950)
13. HARVEY, C.: Fibrinolysin in human semen.
Proc. Soc. Stud. Fertil. 1, 11-17 (1949)
14. HASELOFF, O.W., H. HOFFMANN: Kleines Lehrbuch der Statistik.
Berlin: de Gruyter 1970
15. HIRSCHHÄUSER, C., M. KIONKE: Zur Biochemie des fibrinolytischen Systems im Spermaplasma.
Fortschr. Fertil-Forsch. II, S. 118-122
Berlin: Horsse 1971
16. HOFMANN, N., W. KARLAS: Untersuchungen zur Osmolalität des menschlichen Seminalplasmas.
Arch. Derm. Forsch. 246, 35-46 (1973)
17. HORNSTEIN, O.P.: Entwicklung und aktuelle Bedeutung der Andrologie.
Mensch. med. Wschr. 111, 1956-1963 (1969)
18. JOEL, Ch.: Studien am menschlichen Sperma.
Basel: Schwabe 1960

19. KAULLA, K.N. von, L.B. SHETTLES: Bildung von Ketten des proteolytischen Fermentsystems im menschlichen Spermaplasma, in der Tubenschleimhaut mit Liquor follicularis.
Klin. Wschr. 32, 468-472 (1954)
20. LUNDQUIST, F.: Aspects of the biochemistry of human semen.
Acta physiol. scand. 19, Suppl. 66 (1949)
21. LUNDQUIST, F., F. THORNSTEINSSON, F., O. BUUS: Purification and properties of some enzymes in human seminal plasma.
Biochem. J. 59, 69-79 (1955)
22. MANN, T.: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.
New York: Wiley 1964
23. MAUSS, J.: Die Bestimmung der Spermienzahl und Spermaplasmafructose bei stark erhöhter Ejakulatviskosität.
Der Hautarzt 22, 455-456 (1971)
24. MOGHISSI, K.S.: Human and sperm migration.
Fertil. Steril. 19, 118-123 (1968)
25. MOGHISSI, K.S., D. DABICH, J. LEVINE, O.W. NEUHAUS: Mechanism of sperm migration.
Fertil. Steril. 15, 15-23 (1964)
26. MOLNAR, J.: Allgemeine Spermatologie.
Budapest: Akademiai Kiado 1963
27. RASMUSSEN, J., O.K. ALBRECHTSON: Fibrinolytic activity in human seminal plasma.
Fertil. Steril. 11, 165-277 (1960)

28. REZNICHEK, R.C., J.D. ROUSSEL, N.L. MANGELSON, R.T.KADO,
A.T.K. COCKETT: Some morphologic and biochemical obser-
vations of semen in nemestrina monkeys destined for
space flight.
Int. J. Fertil. 19, 376-381 (1968)
29. ROUSSEL, J.D., C.R. AUSTIN: Enzymatic liquefaction of
primate semen.
Int. J. Fertil. 12, 288-289 (1967)
30. SALTZ-HERMSTEIN: Statistische Untersuchungen über die
Viskosität des menschlichen Samens.
Diss.Erlangen 1973
31. SANTOIANNI, P., G. ARGENZIANO: Enzymatic activities on
nucleic acids and their derivations in human seminal
plasma.
Intern. Kongress für Dermatologie, München, Kongreß-
bericht S. 700-701
32. SHETTLES, L.B.: The polysaccharide composition of human
cervical mucus.
Fertil. Steril. 14, 361 (1963)
33. SCHIRREN, C.: Fertilitätsstörungen des Mannes. Diagnostik,
Biochemie des Seminalplasmas, Hormontherapie.
Stuttgart: Enke 1961
34. SCHIRREN, C.: Praktische Andologie.
Berlin: Hartmann 1971
35. SUOMINEN, J., R. ELLIASSON, N. NIEMI: The relation of
the proteolytic activity of human seminal plasma to
various semen characteristics.
J. Reproduction Fert. 27, 153-156 (1971)
36. VASTERLING, H.W.: Praktische Spermatologie.
Stuttgart: Thieme 1960

Lebenslauf

Ich, Werner Hüttel, wurde am 11. Juli 1947 in Göggingen/Augsburg geboren. Mein Vater war Zahnarzt Dr. Hans Hüttel. Er starb im Mai 1967. Meine Mutter ist MTA Karola Hüttel, geb. Frank.

Nach der Grundschulzeit in Altdorf bei Nürnberg und Wunsiedel/Oberfranken - wohin meine Eltern übersiedelten - wurde ich im mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasium Wunsiedel aufgenommen. Dort wurde ich bis zur Reifeprüfung im Juli 1967 erzogen.

Gleich zum Wintersemester 1967/68 erhielt ich einen Studienplatz für Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen-Nürnberg, 40 Jahre, nachdem sich mein Vater dort immatrikuliert hatte. Das Vorphysikum bestand ich im Februar 1969, das Physikum im August 1970. Während meines 2. klinischen Semesters studierte ich an der Rudolphi-Universität zu Wien. Danach nahm ich eine Doktorarbeit an der Dermatologischen Klinik der Universität Erlangen an. Das medizinische Staatsexamen bestand ich am 4. Dezember 1973.



Buchdruckerei Ludwig Müller - 852 Erlangen, Fahrstraße 5